

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 245–251

Zur näheren Charakterisierung von Trypsininhibitoren bei dem Polychaeten *Sabellastarte indica* (Savigny)

Zweite Mitteilung

Von Charlotte Gauwerky, G. Corman und G. Uhlenbruck

Abteilung für Experimentelle Innere Medizin der Medizinischen Universitätsklinik Köln

(Eingegangen am 15. September 1975/2. April 1976)

Zusammenfassung: Ein Verfahren, Inhibitoren für Trypsin aus den Tentakeln des Anneliden *Sabellastarte indica* Savigny zu isolieren, wird dargestellt. Die ihrem Molekulargewicht nach einheitlichen Trypsininhibitoren werden mittels Natrium-dodecylsulfat-Acrylamidgel-Elektrophorese charakterisiert, ihr Hemmverhalten gegenüber Trypsin, Plasmin und Chymotrypsin beschrieben.

Gegenüber Trypsin besitzen die Inhibitoren aus *Sabellastarte indica* ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von 2:1, wobei Lysin im reaktiven Zentrum die für die Hemmaktivität verantwortliche Aminosäure ist. Dieses reaktive Zentrum für Trypsin ist nicht für die Hemmaktivität gegenüber Chymotrypsin verantwortlich und hat keinen Einfluß auf die Bindung des Inhibitors an Chymotrypsin.

Somit sind die hier beschriebenen Inhibitoren aus *Sabellastarte indica* multi-headed Inhibitoren, wie sie bisher für Invertebraten noch nicht bekannt waren.

Further characterisation of trypsin inhibitors in the polychaet Sabellastarte indica (Savigny), II

Summary: In this paper we describe a method for the isolation of trypsin inhibitors from the tentacles of the annelid *Sabellastarte indica* Savigny. These inhibitors — now homogeneous in their molecular weight — can be characterised by sodium dodecylsulfate-acrylamide gel-electrophoresis, in their inhibitory activity towards trypsin, plasmin and chymotrypsin. The inhibitors from *Sabellastarte indica* possess a stoichiometric binding relation of 2:1 for trypsin, lysine being the amino-acid in the reactive centre of the inhibitor responsible for interaction with trypsin. The reactive centre for trypsin is not identical with the reactive centre which binds chymotrypsin and does not influence the binding of chymotrypsin. These newly described inhibitors are therefore multiheaded, a type not previously described for invertebrates.

Einleitung

In der ersten Mitteilung (1) berichteten wir über neue Proteaseinhibitoren bei dem Polychaeten *Sabellastarte indica* Savigny. Wegen ihrer breiten Wirkungsspezifität mit Aktivitäten gegenüber Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin und Pankreaskallikrein schienen sie zunächst den Inhibitoren, wie sie in letzter Zeit für die Invertebraten *Helix pomatia* (2), *Loligo vulgaris* (3) und *Anemonia sulcata* (4) beschrieben wurden, nahe verwandt. Allerdings ließen einige Befunde vermuten, die wir am sogenannten Rohextrakt erheben könnten, daß es sich hierbei um Inhibitoren handeln könnte, wie sie bisher für Invertebraten nicht beschrieben wurden. Hierzu zählt das Molekulargewicht von 25100, der im schwach sauren Bereich liegende isoelektrische Punkt, sowie die Wärmeempfindlichkeit.

Um die Eigenschaften unseres Inhibitormaterials mit denen zahlreicher anderer natürlicher Inhibitoren vergleichen zu können, war es von Interesse, einen Weg zur Reindarstellung der Trypsininhibitoren von *Sabellastarte indica* Savigny zu finden, so daß eine genauere Charakterisierung möglich wurde. Darüber hinaus haben wir in Tabelle 1 die wichtigsten Eigenschaften einiger Invertebrateninhibitoren und zusätzlich weniger Inhibitoren, wie sie bei Pflanzen und Vertebraten vorkommen, zusammengestellt. Sie sollen in der Diskussion Berücksichtigung finden.

Material

Ausgangsmaterial, Enzyme und Substrate kamen wie in unserer ersten Mitteilung zur Anwendung (1). 4-Guanidino-4-benzoesäure-nitrophenylester-hydrochlorid und Schweinetrypsin, po-

Tab. 1. Schematische Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften von Proteaseinhibitoren, die bei Invertebraten vorkommen. Zusätzlich sind einige pflanzliche und für Vertebraten beschriebene Inhibitoren aufgeführt.
 T = Trypsin, C = Chymotrypsin, P = Plasmin, K = Kallikrein, Pep = Pepsin, Gastr. = Gastricin, E = Elastase, Sub. = Subtilisin, AKr = Akrosin

	Name	Hemm-spektrum	Mol-Gew.	Chemie	reaktives Zentrum	x-headed	Ref.
Pflanzen	Sojabohne	„Kunitz-Inhibitor“ T, C, AKr „Bowman-Birk-Inhibitor“ T, C, AKr	20 100 8 000	Protein Protein	Arg ⁶³ -Ile ⁶⁴ Lys ¹⁶ -Ser ¹⁷ Leu ⁴³ -Ser ⁴⁴	single double	9, 10 11, 12, 13
	Limabohne	T, C	9 000	Protein	Lys ²⁸ -Ser ²⁹ Leu ⁵⁵ -Ser ⁵⁶	double	14, 15, 16
Invertebraten	<i>Anemonia sulcata</i>	T, C, P, K, AKr	6 500	Protein	Arg	single	4
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Pepsin-Inhibitor Carboxypeptidase-A-Inhibitor Trypsin-Inhibitor Chymotrypsin-Inhibitor	Pep., Gastr., Kathepsin E Carboxypeptidase T C, E, Sub.	16 000 ~8 000	Protein Arg, Lys	single single single or double	17, 18, 19
	<i>Hirudo medicinalis</i>	„Hirudin“ „Bdellin A“ „Bdellin B“	Thrombin T, P, AKr T, P, AKr	9 060 6 000 5 000	Protein Protein Protein	indirekte Wirkung Lys Lys	20, 21 22 22
	<i>Lumbricus terrestris</i>		T, P, K, Sub., AKr.	6 100	Protein		23
	<i>Loligo vulgaris</i>		P, C, K	6 800	Protein	Lys/Arg	single (double?) 3
	<i>Achatina fulica</i>		T	~70 000			24
	<i>Helix pomatia</i>	Eiweißdrüsen-Inhibitor polyvalent „sekret. Inhibitor“ „Hämolymphe“	T, C, Subtilisin, P, Thermolysin, Pronase, Proteinase K, Papain T, C, P, K T, K T	~40 000 6 500 hochmol. niedermol.	Glykoprotein? Protein Glykoprotein?	 Arg, Lys single	5, 25 2 6
	<i>Pomatia canaliculata</i>	„Ovorubin“	T, C, Pronase, Subtilisin, Takadiastase	330 000	Chromoglykoprotein		26, 27
Vertebraten	Russel's Viper	Russel's Viper Inhibitor II (Toxin)	T, P, K, C	6 900	Protein	Arg ¹⁷	28
	<i>Hemachatus</i>	Toxin Inhibitor II	T, P, C, K	6 300	Protein		28
	<i>Dendroaspis polylepis</i> (black mamba)	Toxin I Toxin K	T, P, C, K	6 000	Protein		29
	Huhn	„Ovomucoid“ „Ovoinhibitor“	T T, C, Sub.	28 000 49 000	Glykoprotein Glykoprotein	Arg Arg	single multi 31, 8
	Ente	„Ovomucoid“	T, C	28 000	Glykoprotein	Lys	multi 32
	Rind	„Kazal-Inhibitor“ (sekretor.) „Colostrum-Inhibitor“ „Kunitz-Inhibitor“	T T, AKr T, P, C, K	6 155 12 000 6 500	Protein Glykoprotein Protein	Arg ¹⁸ -Ile ¹⁹ Lys ¹⁸ -Ala ¹⁹ Lys ¹⁵ -Ala ¹⁶	single single single 33, 34 35

lymer an CM-Cellulose gebunden, bezogen wir von der Fa. Merck.

Für die chromatographische Trennung wurde Bio Gel P-2, Mesh 100-200 von Bio Rad, Sephadex G 150 fine von Pharmacia und DEAE-Cellulose 23 SS von der Fa. Serva benutzt.

Methoden

Enzymbestimmungen

Die Bestimmungen von Trypsin und Plasmin vom Schwein mit N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid als Substrat, von Chymotrypsin vom Rind mit N-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid als Substrat führten wir nach den allgemein üblichen Methoden (36) durch. Die Titration von Trypsin gegen 4-Guanidino-4-benzoesäure-nitrophenylester-hydrochlorid wurde nach Chase & Shaw (37) durchgeführt, die Dissoziationskonstante nach Green & Work (38) berechnet. Die Bestimmung von Pankreaskallikrein (Schwein) erfolgte mittels des Umsatzes von NAD-Oxidoreduktase im modifizierten Verfahren (39).

Eiweißbestimmungen

Die Eiweißbestimmungen mit Rinderserumalbumin als Standard erfolgten mit dem Folin-Cioaltes-Reagenz nach Lowry (41).

Isolierungsprozeß

Für die Reindarstellung unseres Inhibitormaterials wurde der dunkelgrüne wäßrige Rohextrakt aus den Tentakeln von *Sabellastarte indica* mit doppeltem Volumen 0,08 mol/l Perchlorsäure für 30 Minuten bei 50 °C erhitzt. Anschließend kühlten wir sofort auf Raumtemperatur ab und neutralisierten mit Natronlauge. Das hierbei denaturierte Protein wurde danach 30 Minuten bei 2600 g abzentrifugiert (= Lösung I). Zur Entfernung von fett- und lipoidlöslichen Bestandteilen extrahierten wir Lösung I mit dem gleichen Volumen Chloroform. Das inhibitorhaltige Material (Lösung II) war danach nahezu farblos.

Die chromatographische Trennung schloß sich daran wie folgt an: Lösung II wurde über eine Bio Gel P-2-Säule (2,5 × 80 cm) entsalzt. Eluiert wurde mit dest. Wasser bei einer Geschwindigkeit von 50 ml/h, wobei Fraktionen von 10 ml gesammelt wurden. Die inhibitorhaltigen Fraktionen – wir bestimmten lediglich die Hemmaktivitäten gegenüber Trypsin – wurden gereinigt und lyophilisiert. Die getrocknete Substanz haben wir in geringem Volumen dest. Wasser gelöst, so daß Proteinkonzentrationen von 1–2 g/l vorlagen (Lösung III).

Dieses entsalzte vorgereinigte Präparat wurde anschließend über Sephadex G 150 fine (2,5 × 100) mit dest. Wasser als Elutionsmittel chromatographiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20 ml/h, das Volumen der einzelnen Fraktionen 4,8 ml. Die Registrierung des Proteingehaltes erfolgte wegen der erheblichen Verstärkung bei 206 nm. Wieder wurden die inhibitorhaltigen Fraktionen vereinigt, gefriergetrocknet und in geringem Volumen dest. Wasser gelöst (Lösung IV).

Die weitere Auftrennung des im Molekulargewicht jetzt einheitlichen Materials erfolgte an DEAE-Cellulose, die mit 0,05 mol/l Ammoniumacetat pH = 7,4 äquilibriert wurde (Säule 2,5 × 35 cm) unter Anwendung eines linearen NaCl-Gradienten bis zum Zusatz von 0,5 mol/l NaCl. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20 ml/h, das Fraktionsvolumen 4,8 ml. Dieser Reinigungsvorgang ist in Abbildung 1 schematisch wiedergegeben.

Elektrophorese

Die Acrylamidgelelektrophorese wurde in 7,5 g/l Trenngel bei pH = 8,9 nach Maurer (41), die SDS-Acrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (42) in 120 g/l Trenngel durchgeführt.

Absorption an polymer gebundenes Trypsin (CM-Cellulose)

Trypsingebundene CM-Cellulose wurde 4 Stunden in 0,1 mol/l Triethanolaminpuffer pH = 7,8 mit einem Zusatz von 0,4 mol/l NaCl äquilibriert. Über Nacht erfolgte die Absorption von Inhibitormaterial bei 4 °C. Danach wurde abzentrifugiert und der

Überstand auf Inhibitoraktivität gegen Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Organkallikrein getestet.

Charakterisierung der reaktiven Zentren

Modifizierungsversuche

Zur näheren Charakterisierung des reaktiven Zentrums führten wir Modifizierungsversuche mit Maleinsäureanhydrid und Butandion(2, 3), wie bei Fritz et al. (43) und Goldberg & Pressmann (44) beschrieben, für das gereinigte Inhibitormaterial-Lösung IV durch.

a) Hierbei wurde 0,05 ml gereinigtes Inhibitorpräparat zusammen mit 20 mg Maleinsäureanhydrid, 58 mg NaHCO₃, 0,125 ml 1 mol/l NaHCO₃ und 0,8 ml H₂O 10 Minuten im Eisbad verrührt und ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach führten wir Inhibitorbestimmungen für Trypsin und Chymotrypsin durch.

b) Das mit Maleinsäureanhydrid modifizierte Inhibitormaterial wurde weiter mit dem gleichen Volumen Butandion(2, 3) versetzt. Bis zu 20 Stunden danach testeten wir die Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin aus.

Ermittlung von unabhängigen reaktiven Zentren für Trypsin und Chymotrypsin

0,1 ml Inhibitorlösung wurden mit 0,4 ml Chymotrypsinlösung in Triethanolaminpuffer pH = 7,8 für 5 Minuten vorinkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung von noch vorhandener Hemmaktivität gegenüber Trypsin. Umgekehrt wurden 0,2 ml Inhibitorlösung mit ausreichender Menge Trypsin 5 Minuten lang vorinkubiert und nach weiterer Zugabe von Chymotrypsin die noch vorhandene Hemmaktivität diesem Enzym gegenüber ermittelt.

Ergebnisse

Ausgangswerte

Die Ergebnisse der enzymatischen und Eiweißbestimmungen, wie wir sie für das Ausgangsmaterial ermittelt haben, sind in der schematischen Abbildung 1 enthalten.

Reinigungsvorgang (vgl. Abb. 1)

In unserer ersten Mitteilung (1) konnten wir bereits beschreiben, daß das Trypsin-inhibierende Material in dem Tentakelrohextrakt von *Sabellastarte indica* nur wenig temperatur- (bis 56 °C), aber sehr säurestabil ist (0,08 mol/l Perchlorsäure). Es war deshalb möglich, mittels Säurefällung bei mäßiger Erwärmung nicht-trypsininhibitorhaltige Proteine abzutrennen. Die anschließende Chloroformextraktion zur Entfernung von Fetten und lipoidlöslichen Bestandteilen führte zu einem nahezu farblosen Material. Dieses Material (Lösung II) besaß eine spezifische Aktivität von 1707,9 IU/g gegenüber Trypsin. Die Entsalzung an Bio Gel P-2 mit dest. Wasser als Elutionsmittel und die anschließende Lyophilisierung führte zu der recht konzentrierten Lösung III (mit 1–2 g Protein/l), deren Bestandteile jetzt über Sephadex G 150 fine nach Molekulargewicht getrennt wurden. Abbildung 2 zeigt ein typisches Diagramm, wie wir es bei der Gelfiltration wiederholt erhielten. Die enzymatischen Bestimmungen ergaben dabei regelmäßig die Lage unseres Trypsininhibitormaterials im mittleren Peak. Die Vereinigung der inhibitorhaltigen Fraktionen und anschließende Gefrieretrock-

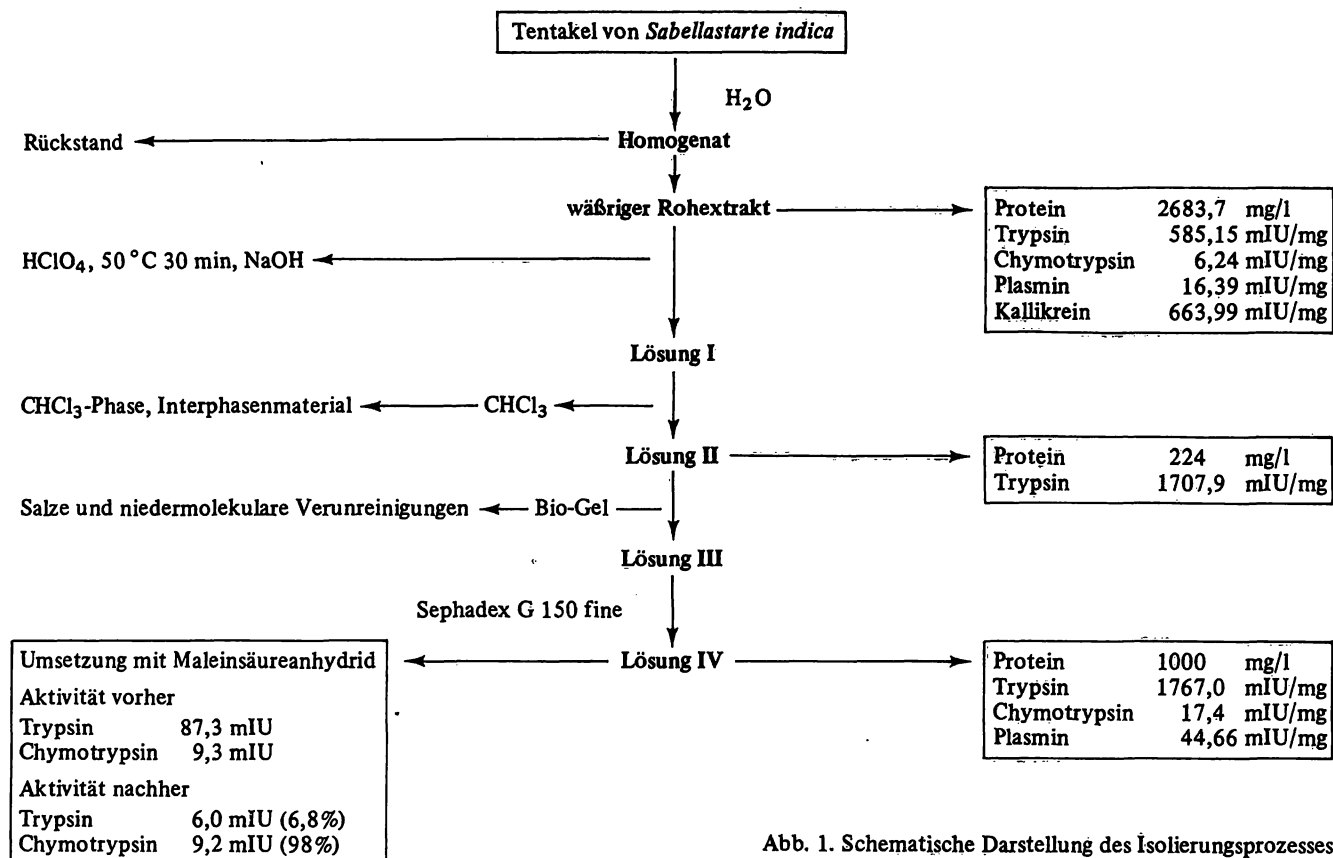
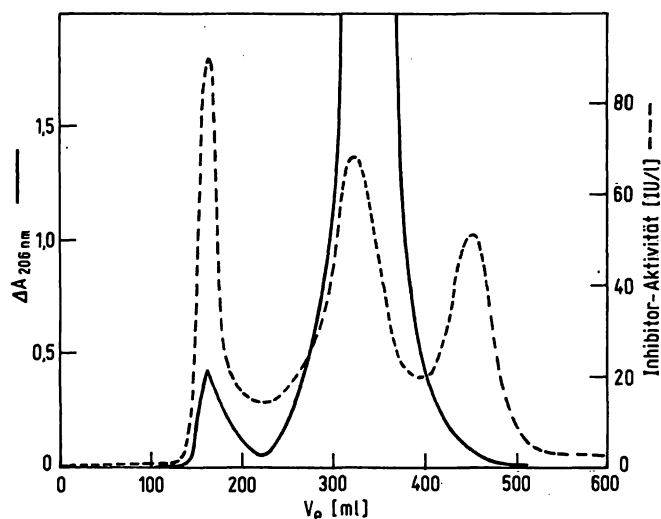


Abb. 1. Schematische Darstellung des Isolierungsprozesses

Abb. 2. Gelfiltration des vorgereinigten entsalzten Inhibitorpräparats (Lösung III) an Sephadex G 150 fine $\Delta A_{206 \text{ nm}}$ —, Hemmaktivität gegenüber Trypsin —, oben: SDS-Acrylamidgelelektrophorese der molekulargewichtsmäßig einheitlichen Substanz in Lösung IV.

nung brachte uns die konzentrierte Lösung IV (spez. Aktivität 1767 IU/g).

Diese molekulargewichtsmäßig einheitliche Lösung IV — auch in der SDS-Acrylamidgelelektrophorese stellte sie sich als einzige proteinhaltige Bande dar (Abb. 2) — wurde an DEAE-Cellulose mit Hilfe eines linearen NaCl-

Gradienten weiter aufgetrennt. Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, daß hierbei 3 proteinhaltige Hauptanteile mit Inhibitoraktivität voneinander zu unterscheiden waren. Hierbei dürfte es sich um die chromatographische Trennung der 3 Hauptbänder handeln, die in der Acrylamidgelelektrophorese ohne SDS-Zusatz regelmäßig gefunden wurden.

Hemmverhalten gegenüber Trypsin

In Abbildung 4 ist die Titrationskurve von Lösung IV gegenüber Trypsin wiedergegeben. Sie verläuft bis zu 88,2% Hemmung linear.

Nach Titration von Trypsin gegen 4-Guanidino-4-benzoesäure-nitrophenylester-hydrochlorid ließ sich ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von Inhibitor: Trypsin etwa gleich 1:2 ermitteln, was bedeutet, daß jedes Inhibitor-molekül zwei reaktive Zentren für Trypsin besitzt. Die Dissoziationskonstante berechnete sich zu $4 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$.

Absorptionsversuche

Um zu klären, ob verschiedene Inhibitoren für Trypsin und Chymotrypsin nebeneinander in unserem Präparat existieren, führten wir Absorptionsversuche mit polymer an CM-Cellulose gebundenem Schweinetrypsin durch. Nach Absorption über 16 Stunden bei 4 °C waren im Überstand keinerlei Aktivitäten gegenüber Trypsin,

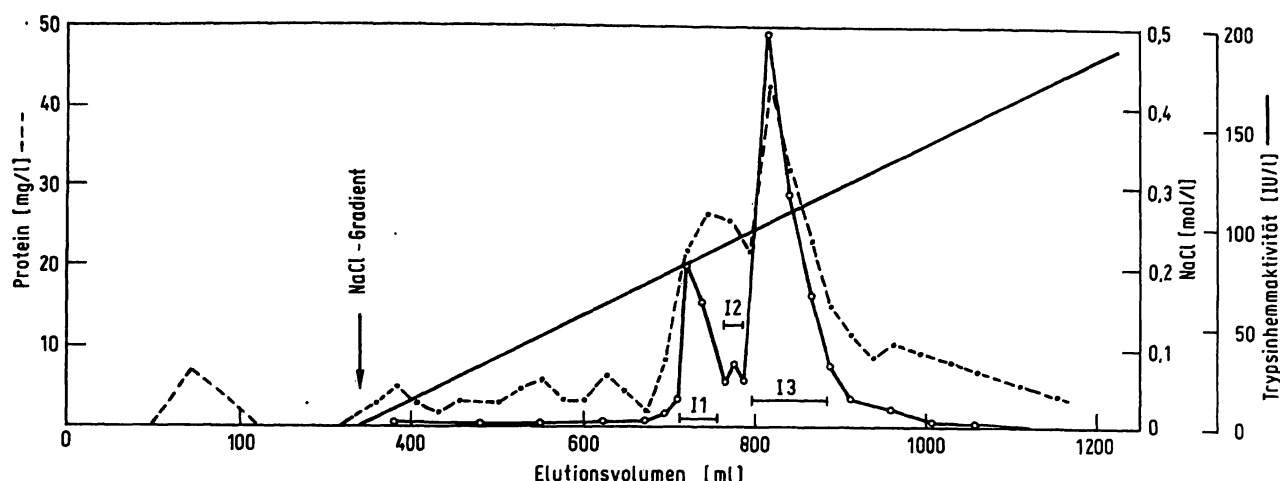


Abb. 3. Chromatographie von Lösung IV an DEAE-Cellulose unter Anwendung eines linearen NaCl-Gradienten. Protein ---, Hemmaktivität gegenüber Trypsin —

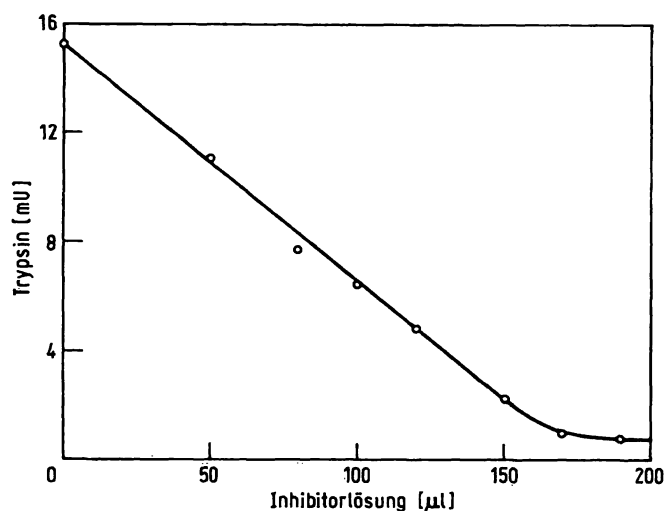


Abb. 4. Titrationskurve der Lösung IV gegenüber Trypsin.

Plasmin oder Chymotrypsin nachweisbar, so daß es sich insgesamt ergibt, daß jedes Inhibitor-molekül reaktive Zentren für Trypsin und für Chymotrypsin besitzt.

Reaktive Zentren

a) Um zu entscheiden, ob ein Lysin- oder Argininrest im reaktiven Zentrum für die Trypsininaktivierungsfähigkeit verantwortlich ist, modifizierten wir Lösung IV mit Maleinsäureanhydrid. Die in Abbildung 1 aufgeführten Ergebnisse lassen erkennen, daß nur 6,8% der eingesetzten Inhibitoraktivität erhalten bleibt gegenüber Trypsin nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid. Wir können daraus schließen, daß fast ausschließlich Lysin die Aminosäure ist, die von Trypsin im reaktiven Zentrum erkannt wird. Ferner zeigen die Ergebnisse, daß 98% der Aktivität gegenüber Chymotrypsin erhalten bleibt. Hieraus ergibt sich, daß für Trypsin und Chymotrypsin verschiedene reaktive Zentren vorhanden sind.

Den mit Maleinsäureanhydrid modifizierten Inhibitor versetzten wir zusätzlich mit dem Butandionreagenz, um einen eventuell bestehenden Anteil von Argininresten an der Inhibitorwirksamkeit der reaktiven Zentren zu beurteilen. Wir konnten hierbei die noch vorhandene Aktivität von 6,8% auf 0,53% herabsetzen, mußten dazu allerdings das Reaktionsgemisch ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. Diese Verminderung der noch bestehenden Inhibitoraktivität durch das Butandionreagenz ist somit unspezifisch.

b) Daß für Trypsin und Chymotrypsin unabhängig voneinander existierende reaktive Zentren, die nicht einmal einander überlappen, vorliegen, konnte dadurch gezeigt werden, daß nach Vorinkubation von Inhibitor-materiale mit Chymotrypsin dieselbe Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin vorliegt wie ohne Vorbehandlung. Umgekehrt war ebenfalls keine Verminderung der Hemmaktivität gegenüber Chymotrypsin zu finden, wenn wir Inhibitorlösung mit äquivalenten Mengen Trypsin vorinkubierten.

Diskussion

Die in Abbildung 1 wiedergegebene methodische Darstellung mit der Aufstellung der Ergebnisse macht deutlich, daß ein recht einfaches Isolierungsverfahren zu der im Molekulargewicht einheitlichen Lösung IV führt. Daß lediglich um den Faktor 3 angereichert wurde, bestätigt den Befund, den wir bereits in unserer ersten Mitteilung (1) darlegen konnten, daß nämlich, verglichen mit anderen inhibitorhaltigen Lösungen, der Rohextrakt aus den Tentakeln von *Sabellastarte* eine erstaunliche Einheitlichkeit und Konzentration aufweist. Während des Reinigungsvorganges kommt es ebenfalls zu einer Anreicherung der Inhibitoraktivitäten gegenüber Plasmin und Chymotrypsin, nicht dagegen der Kallikrein-inhibitoraktivitäten. Der Kallikrein inhibierende Anteil wird bei der Isolierung der Trypsininhibitoren, die ebenfalls Plasmin und Chymotrypsin hemmen, abgetrennt. Auf

einen isoliert vorliegenden Kallikreininhibitor im Rohextrakt weist auch die Tatsache hin, daß nur gegenüber Kallikrein progressives Hemmverhalten besteht.

Bei der im Molekulargewicht einheitlichen Lösung IV konnten wiederholt durch Ionenaustauschchromatographie 3 Proteinfractionen unterschieden werden. Auf Grund unserer Untersuchungen muß vermutet werden, daß es sich hierbei um biologisch und im Molekulargewicht identische, aber in ihrer Ladung verschiedene Proteine handelt, die möglicherweise Isoinhibitoren darstellen.

Das Bindungsverhältnis Trypsin-Inhibitor beträgt 2:1. Die mit Trypsin reagierende Aminosäure ist Lysin, wie es sich auch bei vielen anderen Inhibitoren findet. Somit ist Lösung IV für Trypsin ein double-headed-Inhibitor. Wir konnten ebenfalls finden, daß diese zwei reaktiven Zentren, die pro Inhibitormolekül für Trypsin vorliegen, für die Hemmaktivitäten gegenüber Chymotrypsin nicht verantwortlich sind und sich auch nicht mit diesen überlappen. Die Trypsininhibitoren aus *Sabellastarte indica* sind somit multi-headed, was für Proteaseinhibitoren bei Invertebraten hiermit zum ersten Mal beschrieben wird. Das Vorliegen unabhängiger, nicht überlappender Zentren (s. Tab. 1) ist zur Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin für die Inhibitoren aus Sojabohne (13) (*Bowman-Birk*), Limabohne

(16), für den Submandibularis-Inhibitor vom Hund (46), den Ovoinhibitor aus Hühner-Eiklar (31) und einige Ovomucoide von Vögeln (8) bekannt.

Hinsichtlich des Molekulargewichts und der Bindungsverhältnisse für Trypsin und Chymotrypsin sind die isolierten Inhibitoren aus *Sabellastarte indica* dem Ovomucoide aus Enten-Eiklar (Tab. 1) am ehesten vergleichbar. Allerdings sind Ovomucoide aus Vogeleiern Glykoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von etwa 15% (30). Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß es sich bei unseren Inhibitoren um Proteine mit einem Zuckeranteil (bis zu etwa 5%) handelt. Da die genaue Zusammensetzung von Interesse ist, wird sie zur Zeit von uns geklärt.

Danksagung

Herrn Dr. *Truscheit* und Herrn Dr. *Reinhardt* aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium der Bayer AG, Wuppertal und Herrn Dr. *Jacobi* von der Firma NOVO, Mainz, möchten wir an dieser Stelle für die Bereitstellung von Enzympräparationen danken.

Ebenfalls danken wir Fr. *G. Gottschlich* für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die sorgfältig angefertigten Zeichnungen.

Literatur

- Gauwerky, C., Corman, G. & Uhlenbruck, G. (1975), diese Z. 13, 429–435.
- Tschesche, H. & Dietle, Th. (1971) Eur. J. Biochem. 30, 560–570.
- Tschesche, H. & v. Rücker, A.: (1973) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1447–1461.
- Fritz, H., Brey, B. & Beress, L. (1972), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 19–30.
- Uhlenbruck, G., Sprenger, I. & Herman, G. (1971), diese Z. 9, 494–496.
- Werle, E., Appel, W. & Happ, E. (1958), Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 234, 364–372.
- Vogel, R., Trautschold, I. & Werle, E. (1966), Natürliche Proteinase-Inhibitoren. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Rhodes, M. B., Bennett, N. & Feeney, R. E. (1960), J. Biol. Chem. 235, 1686–1693.
- Koide, T. & Ikenaka, T. (1973), Eur. J. Biochem. 32, 401–407.
- Koide, T., Tsunasawa, S. & Ikenaka, T. (1972), J. Biochem. 71, 165–167.
- Millar, D. B. S., Willick, G. E., Steiner, R. F. & Frattali, V. (1969), J. Biol. Chem. 244, 281–284.
- Ikenaka, T., Odani, S. & Koide, T. (1974), in Bayer Symposium V. Proteinase Inhibitors. (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. & Truscheit, E., Eds.) p. 326–343, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Birk, J. & Gertler, A. (1971), in Proceedings of The International Research Conference on Proteinase Inhibitors (Fritz, H. & Tschesche, H., Eds.) p. 142–148, Walter de Gruyter, Berlin.
- Haynes, R. & Feeney, R. E. (1967), J. Biol. Chem. 242, 5378–5385.
- Tschesche, H. (1974), Angew. Chem. 86, 21–40.
- Stevens, F. C. (1971), in l. c. (13) 149–155.
- Peanasky, R. J. & Abu-Erreish, G. M. (1971) in l. c. (13) 281–293.
- Peanasky, R. J., Abu-Erreish, G. M., Gansh, C. R., Homandberg, G. A., O'Heeron, D., Linkenheil, R. K. & Kucich, U. (1974), in l. c. (12) 649–666.
- Keilová, H. & Tomásek, V. (1972), Biochim. Biophys. Acta 284, 461–461.
- Triebel, H. & Walsmann, P. (1966), Biochim. Biophys. Acta 120, 137–147.
- Markwardt, F. (1970), in Methods in Enzymology XIX (Perlman, G. & Lorand, L., Eds.) 924–932.
- Fritz, H., Gebhardt, M., Meister, R. & Fink, E. (1971), in l. c. (13), 27–280.
- Illchmann, K. & Werle, E. (1974), in l. c. (12) 282–283.
- Kareem, H. A., Gilles, A., Nguyen-Thauh, T. & Keil, B. (1973), Comp. Biochem. Physiol. B44, 963–970.
- Michalla, J. & Uhlenbruck, G. unveröffentlicht.
- Cheesman, D. F. (1958), Proceedings of the Royal Society B149, 571–587.
- Norden, D. A. (1972), Comp. Biochem. Physiol. B42, 569–576.
- Takahashi, H., Iwanaga, S., Kitagawa, T., Hokama, Y. & Suzuki, T. (1974), in l. c. (12) 265–276.
- Strydom, D. J. (1973), Nature (Lond.) New Biol. 243, 88–90.
- Lin, Y. & Feeney, R. E. (1971), in The Glycoproteins, 2nd Ed. Gottschalk, A., ed.) 762–781, Elsevier N. Y.
- Tomimatsu, Y., Clary, J. J. & Burtulovich, J. J. (1966), Arch. Biochem. Biophys. 115, 536–544.
- Matsushima, K. (1958), Science 127, 1178.
- Greene, L. J., Rigbi, M. & Fackre, D. S. (1966), J. Biol. Chem. 241, 5610–5618.
- Greene, L. J. & Guy, O. (1971), in l. c. (13) 201–206.

35. Cechová, D., Janáková, V. & Sorm, F. (1971), in l. c. (12) 105–107.
36. Fritz, H., Trautschold, I. & Werle, E. (1974), in Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H., Ed.) Verlag Chemie, Weinheim, 2. Aufl. 1105–1122.
37. Chase, Th. & Shaw, E. (1967), Biochim. Biophys. Res. Commun. 29, 508–514.
38. Green, N. M. & Work, E. (1953), Biochem. J. 54, 347–452.
39. Trautschold, I., Werle, E. & Schweitzer, G. (1974), in l. c. (36) 1071–1080.
40. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265–275.
41. Maurer, H. R. (1971), Disc Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin.
42. Laemmli, K. (1970), Nature 227, 680–685.
43. Fritz, H., Fink, E., Gebhardt, M., Hochstrasser, K. & Werle, E. (1969), Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 933–944.
44. Goldberg, A. L. & Pressmann, D. (1968), Biochemistry 7, 272–279.
45. Fritz, H., Janmann, E., Meister, R., Pasquay, P., Hochstrasser, K. & Fink, E. (1971), in l. c. (13) 257–270.

Prof. Dr. G. Uhlenbruck
Kerpener Straße 15
5000 Köln 41

